

PLANT GROWTH PROMOTER

Patent number: JP2000191421
Publication date: 2000-07-11
Inventor: MATSUDAIRA OSAMU
Applicant: MATSUDAIRA OSAMU
Classification:
- international: A01N63/00
- european:
Application number: JP19990286416 19991007
Priority number(s):

Report a data error here

Abstract of JP2000191421

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject agent acting on whole plant and so improving plant yield and useful for growth promotion of Suaeda ghuca, Spinacia oleraceae, large sized Shantung vegetables or the like by including a microbe belonging to Pseudomonas maginalis or its variant as an effective ingredient.

SOLUTION: This agent is obtained by including a microbe belonging to Pseudomonas maginalis or its variant [preferably Pseudomonas sp. M-1 (FERM P-16437)] as an effective ingredient. The microbe is obtained by working an aqueous solution of 5,6-dimethyluracil in a soil for long period of about one year and gathering therefrom wherein the soil is obtained by mixing leaf mold with a modified material such as lime-added and heat-pressed peat-moss. The application of the agent is e.g. soaking seeds in the agent and sowing wherein microbe number is preferably 106-107/mL in the above mentioned solution and soaking is preferably for 1-3 day.

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-191421

(P2000-191421A)

(43) 公開日 平成12年7月11日 (2000.7.11)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード (参考)

A 0 1 N 63/00

A 0 1 N 63/00

F

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平11-286416

(22) 出願日 平成11年10月7日 (1999.10.7)

(31) 優先権主張番号 特願平10-298165

(32) 優先日 平成10年10月20日 (1998.10.20)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 595150250

松平 理

埼玉県川越市六軒町1-21-3

(72) 発明者 松平 理

埼玉県川越市六軒町1-21-3

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外4名)

(54) 【発明の名称】 植物生長促進剤

(57) 【要約】

【解決手段】 シュードモナス マルギナリス (*Pseudomonas marginalis*) 又はその変異体に属する微生物を有効成分とする植物生長促進剤。

【効果】 安価に製造でき、優れた植物生長促進効果を示すので植物の処理回数も少なくてよい。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シュードモナス マルギナリス(*Pseudomonas marginalis*)又はその変異体に属する微生物を有効成分とする植物生長促進剤。

【請求項2】 シュードモナス マルギナリスに属する微生物が、シュードモナス エスピー M-1と命名され、FERM P-16437として寄託された微生物である請求項1記載の植物生長促進剤。

【請求項3】 シュードモナス エスピー(*Pseudomonas* sp)M-1と命名され、FERM P-16437として寄託された微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は植物生長促進剤に関し、詳細には、植物の生長を促進させることにより、植物体の収量向上、開花促進、生育期間延長等の効果を有する新規な植物生長促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】植物の生長を促進し、その収量を増大させることは、重要であり、従来、多くの植物生長促進剤の研究がなされてきた。このうち、植物ホルモンは、植物の器官の一部に作用するものがほとんどであり、植物全体に作用し、収量を増大させるものではなかった。

【0003】一方、植物全体に作用するものとしてN-アリル-N-メチルグリシン等の光合成能力向上薬物、植物ホルモン等が開発されているが、その作用は小さく、充分満足できるものではなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的は、植物全体に作用し、植物の収量を向上させる植物生長促進剤を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】斯かる実状に鑑み本発明者は鋭意研究を行った結果、シュードモナス マルギナリス又はその変異体に属する微生物が極くわずかでも優れた植物生長作用を有することを見出し、本発明を完成した。

【0006】すなわち本発明は、シュードモナス マルギナリス(*Pseudomonas marginalis*)又はその変異体に属する微生物を有効成分とする植物生長促進剤を提供するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の植物生長促進剤の有効成分であるシュードモナス マルギナリス又はその変異体は、例えばビートモス、泥炭などに石灰を加え加熱加圧

した改良資材に腐葉土を混合した土壤中に5, 6-ジメチルウラシル水溶液を長期1年程度作用させ、その土壌から採取することができる。

【0008】また、シュードモナス マルギナリス又はその変異体は、通常の栄養培地で増殖させることができるが、例えば通常の有機物や塩類を含む栄養培地で前培養後、更に有機物以外に簡単な液体肥料、例えば、窒素、リン酸、カリウムの無機塩を含む水溶液を培地として本培養すれば、 $10^6 \sim 10^7$ /ml程度の菌体数を得ることができるので、この培養液をそのまま又は殺菌して植物生長促進剤として用いることができる。なお、シュードモナス フルオレセンシスは、拮抗微生物として公知であり、生育促進効果を有することも知られている〔拮抗微生物による病害防除(農山漁村文化協会)、植物化学調節学会(第30回大会B-30, 58P)〕。しかしながら、シュードモナス マルギナリスが植物生長促進剤の有効成分となり得ることは知られていない。

【0009】本発明で用いるシュードモナス マルギナリス又はその変異体としては、特に制限されないが、例えば次の分類学的性質を示すM-1株が挙げられる。

【0010】(1) 方法

1) DNAのGC%測定〔FEMS Microbiol.Lett., 67:127-130(1990)〕

菌体から抽出したDNAを各塩基に分解後、更にリン酸基をはずし、ヌクレオシドとして液体クロマトグラフィーにより各塩基のモル比を算出し、GC%を求めた。

2) 生化学性状試験

表1に示したように形態、培養性状、各種生理学的性状について試験した。生理学的性状試験については新細菌培地学講座<第二版>、(株)近代出版、1998に記載されている方法に準じて試験管法により行った。

3) 簡易同定キットによる試験

アビ20NE(日本ビオメリュー・バイテック(株))により同定した。

【0011】(2) 結果

1) DNAのGC%測定

M株のGC%は56.7%であった(表1)。同時に測定した*Pseudomonas aeruginosa*のGC%は64.4%であった。

2) 生化学性状試験

各性状試験の結果は表1に示す。

3) 簡易同定キットによる試験

結果は表2に示す。

【0012】

【表1】

各種性状試験結果

試験項目	結 果	試験項目	結 果
形態	桿菌	L-アラビノースからの酸産生	+
大きさ	約1.0-2.0×0.5μm	D-キシロースからの酸産生	+
運動性	陽性	グルコースからの酸産生	+
孢子形成	陰性	D-マンノースからの酸産生	+
		D-フラクトースからの酸産生	+
		D-ガラクトースからの酸産生	+
肉汁寒天平板培養		マルトースからの酸産生	-
コロニーの色	淡黄色	白糖からの酸産生試験	+
コロニーの透明度	不透明	乳糖からの酸産生	-
コロニーの形態	平滑	トレハロースからの酸産生	+
コロニーの光沢	鈍い光沢	D-ソルビトールからの酸産生	-
肉汁液体培養		D-マンニトールからの酸産生	+
表面発育状況	良好	イノシトールからの酸産生	+
濁度	白濁	グリセリンからの酸産生	+
肉汁寒天穿刺培養		デンプンからの酸産生	-
生育状況	上部は下部より良好	α-メチル-D-グルコシドからの酸産生	-
リトマスミルク		エスクリン加水分解	+
反応	アルカリ性	マロン酸利用	+
凝固	陽性	アルギニンジヒドラーゼ	+
		リシンデカルボキシラーゼ	-
		オルニチンデカルボキシラーゼ	-
		フェニルアラニンデアミナーゼ	-
グラム染色性	陰性	ONPG	+
硝酸塩の還元	+		
MRテスト	-		
VPテスト	-		
インドールの生成	-	GC%	56.7%
硫化水素の生成	-		
デンプンの加水分解	-		
クエン酸の利用	+		
色素の生成	+(非水溶性)		
ウレアーゼ	+		
オキシダーゼ	+		
カタラーゼ	+		
36℃生育	-		
28℃生育	+		
酸素に対する態度	好気性		
O-Fテスト	酸化		

【0013】

【表2】

アピ20NE試験結果

試験項目	M-1株
硝酸塩の還元	+
インドール産生性	-
ブドウ糖酸化	-
アルギニン脱水素	+
ウレアーゼ	-
β-グルコシダーゼ	-
ゼラチン液化	-
β-ガラクトシダーゼ	-
グルコース同化	+
アラビノース同化	+
マンノース同化	+
マンニトール同化	+
N-アセチル-D-グルコサミン同化	+
マルトース同化	-
グリコン酸同化	+
n-カプリン酸同化	+
アジピン酸同化	-
dl-リンゴ酸同化	+
クエン酸同化	+
酢酸フェニル同化	-

【0014】上記の如く試験したM-1株は、グラム陰性の好気性桿菌であり、グルコースを酸化したオキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性でありシュードモナスに属する菌種と考えられた。しかし、これら試験のみでは種の特定はできないので次のように、16SrRNAの5'末端側500bpの塩基配列からM-1株の同定を実施した。

【0015】<方法>

(1) 核酸の抽出

"Sepa Gene"キット(三光純薬(株)製)を用いて核酸の抽出を行った後、エタノール沈殿により核酸を回収した。

(2) PCR

16SrRNAに特異的なユニバーサルプライマー2種(5'末端側及び3'末端側)を用いて約1.5kbpの増幅を行った。

(3) PCR増幅産物の精製

増幅終了後、スピニングカラム(ファルマシア社製)を用いて精製を行った。

(4) 16SrRNA塩基配列の解析

精製したPCR増幅産物をアプライド バイオシステムズ 377DNA シークエンサー(パーキン エルマー社製)により5'末端側500bpの塩基配列解析を行った。

(5) 16SrRNAデータベース検索による相同性解析

ジーンバンクのデータベースよりオンラインで検索を行った。

【0016】<結果>その結果によると、シュードモナス フルオレセンスと異なり、M-1株は99.6%のホモロジーでシュードモナス マルギナリス(*Pseudomonas marginalis*)と同定された。

【0017】しかしながら、M-1株の分類学的性質は、公知のシュードモナス属の菌株のいずれとも一致しないので、これを新規菌株と判断して、FERM P-16437として通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。M-1株の塩基配列を後記配列表に示す(配列番号1)。

【0018】本発明のM-1株の培養は、上記と同様に有機物や簡単な液体肥料を培地として行えばよい。

【0019】本発明で用いるシュードモナス マルギナリス又はその変異体は上記の方法で得られた培養物をそのまま用いてもよく、また常法により精製して用いてもよい。

【0020】本発明の植物生長促進剤は、シュードモナス マルギナリス又はその変異体のみでも十分効果を奏するものであるが、これ以外に、他の植物生長調節剤；糖類；窒素、リン酸及びカリウムを含む無機塩；尿素、アミノ酸、有機酸、アルコール、ビタミン、その他のミネラル等を配合することができる。また他の農薬、肥料等を本発明の効果を損なわない限り混合して用いてもよい。

【0021】本発明の植物生長促進剤の剤型としては、液剤の他、粉末、粒剤等が挙げられ、これらは常法に従って製造することができる。

【0022】本発明植物生長促進剤を植物に適用するには、次の方法が例示される。

(a.) 種子を本発明植物生長促進剤液に浸漬した後、播種する方法

この液の菌体数は $10^4 \sim 10^8$ /mLとすることが好ましく、特に $10^6 \sim 10^7$ /mLとすることが好ましい。また浸漬は1～3日程度が好ましい。

(b.) 土壌に灌注する方法

(a.)と同様の菌体数の液を60℃、24時間殺菌して用いる。灌注の時期は、植物によって適宜決定すればよいが、本葉が3～6cm位の長さになる時期(播種後12～16日)が好ましい。灌注の量は、10アールあたり無機塩培地〔硝酸アンモニウム5g、リン酸水素2カリウム5gを精製水1Lに溶解し、pH7.0に調整後、高圧滅菌した培地〕にM-1菌を接種し20℃10日間培

養したものの水分蒸発させたもの2kg～4kg程度が好ましい。

(c.) 葉面散布法

(b.)の液を用いて本葉1～2cmの長さになる時期(播種後7～10日)に1回、それ以後10日ごと1～2回散布する。

【0023】上記(a.)、(b.)いずれの方法でも、1回の処理で、(c.)は2～3回の処理で生育が著しく改善され、特に中後期の生育が著しい。そして採取時には、本発明品を用いない対照と比べて1.5～2.5倍の増収となる。また本発明の植物生長促進剤は、開花促進効果及び開花期間延長効果なども有する。

【0024】ただし、処理期間が長すぎたり、菌体濃度が高すぎると生育が抑制されることがあるので、処理期間はそれぞれの作物についてテストして決定することが望ましい。なお、濃度が若干高い場合は、一時的に生育は抑制されるが、その後回復し、最終的に増収に転じる。

【0025】本発明の植物生長促進剤の適用対象となる植物としては、例えば小松菜、ホウレンソウ、大型山東菜、野沢菜、広島菜、ハクサイ、ダイコン、キャベツ、カブ、カボチャ、ピーマン、トマト等の野菜類；イネ、大麦、小麦、ヒエ、トウモロコシ、アワ等の穀物類；ミカン、リンゴ、カキ、ウメ、ナシ、ブドウ、モモ等の果樹類；コスモス、トレニア、キク、ガーベラ、パンジー、ラン、シャクヤク、チューリップ等の花卉類；サツキ、クヌギ、スギ、ヒノキ、ナラ、ブナ等の樹木類；アズキ、インゲン、大豆、ラッカセイ、ソラマメ、エンドウ等の豆類；コウライシバ、ベントグラス、ノシバ等の芝類；ジャガイモ、サツマイモ、サトイモ、ヤマイモ、タロイモ等のイモ類；ネギ、タマネギ、ラッキョウ等のネギ類；アルファルファ、クローバー、レンゲ等の牧草類等が挙げられる。

【0026】これらのうち、花卉類に対しては、開花促進効果をも得ることができる。

【0027】

【発明の効果】本発明の植物生長促進剤の有効成分であるシュードモナス マルギナリス又はその変異体は、簡単な培地で大量に培養でき経済的である。また本発明の植物生長促進剤は生長促進効果に優れるため、肥料として植物に適用でき、その使用量は極くわずかですみ、大量の植物を処理することができる。更に処理は収穫期間が30～40日の作物では1～2回で十分であり、手間がかからないという利点を有する。また、肥料3要素を含む無機塩類を始め尿素など窒素を含む物質中でも容易に培養出来るので、化成肥料系、液体肥料系、緩効肥料系などの効力を増加させることが出来る。もちろん有機質肥料の肥効も増加させ得る。

【0028】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説

明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

【0029】実施例1

ピートモス、泥炭に石灰を加え加熱加圧した改良資料の5Lに腐葉土5Lを混合した土壌中に、5、6-ジメチルウラシル1000PPM水溶液1Lを長期1年間作用させた。この土壌から得た菌を採取した中からシュードモナス エスピー M-1を得た。

【0030】実施例2

実施例1で得られたM-1株を肉汁液体培地（トリプトソーヤブイヨン培地：日本水産製）又は糖蜜100倍水溶液培地中で28℃2日間培養した。次にこの培養液1mLを次の無機塩培地A 1L、又はハイボネックス液肥（ハイボネックスジャパン社製）100倍水溶液1Lにそれぞれ接種し、20℃、10日間培養した。無機塩培地Aは、無機塩（硝酸アンモニウム5g、リン酸水素2カリウム5g）を精製水1Lに溶解し、pH7.0に調整したもの。培養後の菌数は、いずれの培地の場合も約 7×10^6 /mLであった。この生菌又は殺菌液を以下に使用した。

【0031】このようにして得た本発明の植物生長促進剤を以下の条件で植物に適用した。

【0032】1. 土壌

1) タキイプランターの土（タキイ種苗KK）、粒状バワースォル（呉羽化学KK）及び市販培養土。

2) 黒土、赤玉土（小粒）を等量混合させたもの（IB48号又は普通化成肥料、1ポット土500gにつき1g入れた）。なお1)、2)ともに追肥として前記肥料を播種20日後1ポットにつき0.5g～1gを与えた。

上記1)、2)の土壌を1ポットに500g入れ（12cmポリ鉢）それぞれ対照区20ポット、処理区20ポットとした。

【0033】2. 供試作物

小松菜（極楽天）、ハウレンソウ（オカメ）、大型山東菜、野沢菜、広島菜、コスモス。

【0034】3. 処理方法

(a) 種子処理（同一大きさ）

上記種子をそれぞれシャーレに入れこれに上記ハイボネックス液肥100倍水溶液培地で培養した生菌を入れ20℃、1～2日間（1日、大型山東菜・野沢菜・広島菜；1.5～2日、ハウレンソウ・小松菜）浸漬処理する。対照としてハイボネックス液肥100倍水溶液を用いた。1ポットに10ヶ播種、播種後7～10日位本葉の出たところで4本を残し他は取り去る。

【0035】生育状態及び結果

播種14～20日頃より次第に対照と生育に差が出て来て収穫時（播種後40日～50日後）には約1.5～2.0倍位（生体重）の差が見られた（特に後期に生育がいちじるしい）。

【0036】コスモスを3日処理した後播種したものでは茎葉の増大及び開花促進が見られた。

【0037】なお、上記無機塩培地Aで培養した生菌を用いて同一実験を行ってもだいたい同一の結果が得られた（浸漬1日、小松菜・ハウレンソウ、3日コスモス；2倍希釈液1日、大型山東菜・広島菜）。

【0038】(b) 土壌灌注

処理液

1) 前記無機塩培地Aで培養した菌を60℃、24時間殺菌した液（実施例2の殺菌液）。

2) 前記ハイボネックス液肥100倍液で培養した菌を60℃、24時間殺菌した液（実施例2の殺菌液）。

3) 尿素1%水溶液1Lを滅菌し、これに前記肉汁培地（トリプトソーヤブイヨン培地）又は糖蜜100倍水溶液培地でM-1株28℃2日間培養した液1mLを加え20℃、10日間培養した後60℃、24時間で殺菌した液（菌体数は約 7×10^6 ）。

【0039】供試作物

大型山東、小松菜、広島菜。

【0040】処理液として上記1)、2)、3)の3液すべてを用いた。供試作物をそれぞれ30ポット作りそれぞれの供試作物の同大の種子10粒植え、本葉が3～6cmになったところで生育同一位のものを4本残し他は取り去った。これを処理区、無処理区それぞれ15ポットずつとする。処理区には1)、2)、3)液を10～20倍液とし、1ポットにつき20～30mL灌注し、対照区には1)、2)、3)の菌を培養しない無菌液を同じように希釈したものを注入する。いずれも1回の注入のみとした。結果としては一般的に処理後7～14日頃より徐々に生育が促進されていき中～後期（25日～30日）にかけて次第に対照と差が出て灌注後40日～50日では1.5～2倍の増収がみられた。トレニアでは高さ10cm位のものを同ポット4個体とし3)の処理液を用いこれに1ポットにつき10倍液を20mL入れると20日～30日後生育が促進されて開花期促進、開花期延長が見られた。

【0041】(c) 葉面散布

処理液：上記土壌灌注の場合と同じ1)、2)、3)の5倍希釈殺菌培養液。

【0042】供試作物

野沢菜、小松菜。

【0043】発芽10日後本葉が1～2cmになったところで生育同一形の4個体に1回、さらに生育20日後1回、葉面積100cm²につき3～6mL散布した。散布40日後に収穫し生体重を計測したところ、対照（それぞれの菌を培養しない無菌液を同濃度で散布）に比べて1.5～2倍の増収が見られた。

【0044】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<;110>; MATSUDAIRA, OSAMU

<;120>; Growth promoter for plants

<;130>; P04241110

<;160>; 1

<;210>; 1

<;211>; 500

<;212>; DNA

<;213>; Pseudomonas sp M-1

<;400>; 1

```

cggcaggcct aacacatgca agtcgagcgg tagagagaag cttgcttctc ttgagagcgg 60
cggacgggtg agtaatgcct aggaatctgc ctgtagtgg gggataacgt tcggaaacga 120
acgctaatac cgcatacgtc ctacgggaga aagcagggga ccttcgggcc ttgcgctatc 180
agatgagcct aggtcggatt agctagtgg tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgatcc 240
gtaactggtc tgagaggatg atcagtcaca ctggaactga gacacgtcc agactcctac 300
gggaggcagc agtggggaat attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt 360
gtgtgaagaa ggtcttcgga ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg ccattaccta 420
atacgtgatg gttttgacgt taccgacaga ataagcaccg gctaactctg tgccagcagc 480
cgcggtaata cagagggtgc                                     500

```